

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-170976

(43)Date of publication of application : 11.07.1995

(51)Int.Cl.

C12N 9/06
C12Q 1/26
// C12N 1/21
C12Q 1/28
(C12N 9/06
C12R 1:19)
(C12N 1/21
C12R 1:19)

(21)Application number : 05-316951

(71)Applicant : TOYOBO CO LTD

(22)Date of filing : 16.12.1993

(72)Inventor : NISHIYA YOSHIAKI
TEJIMA SHINICHI
KAWAMURA YOSHIHISA

(54) NOVEL ENZYME HAVING N-METHYLVALINE OXIDASE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a novel N-methylvaline oxidase which is useful in determination of N-methylvaline.

CONSTITUTION: This oxidase acts on N-methylvaline in the presence of water and oxygen to form valine, formaldehyde and hydrogen peroxide where the substrate specificity is 100% for N-methylvaline and less than 1% for sarcosine, the optimal pH is 7-9, the optimal temperature is 40 to 50°C, and the molecular weight is 43kd. The enzyme is obtained by substituting another amino acid (preferably valine) for phenylalanine at No.103 in the amino acid sequence of a gene given in the formula of the protein having the sarcosine oxidase activity.

Met Ser Ile Lys Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser
1 5 10 15
Met Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ser Lys Glu Gly Val Lys Tyr
20 25 30
Leu Leu Val Asp Ser Phe His Pro Phe His Thr Asn Gly Ser His Glu
35 40 45

Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Glu Leu Asn Val Thr Gly Lys
50 55 60 65
Ile Gly His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys
65 70 75 80
Glu Lys Glu Thr Ile
85

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's
decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-170976

(43) 公開日 平成7年(1995)7月11日

(51) Int. Cl. ⁴	識別記号	序内整理番号	P I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/06	Z N A B			
C 1 2 Q 1/26		6807-4B		
// C 1 2 N 1/21		6828-4B		
C 1 2 Q 1/28		6807-4B		
(C 1 2 N 9/06				

審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-316951

(22) 出願日 平成5年(1993)12月16日

(71) 出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72) 発明者 西矢 芳昭

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株

式会社敦賀バイオ研究所内

(72) 発明者 手嶋 真一

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株

式会社敦賀バイオ研究所内

(72) 発明者 川村 良久

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株

式会社敦賀バイオ研究所内

(54) 【発明の名称】 N-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素

(57) 【要約】

【目的】 N-メチルバリンの測定に有用であるN-メチルバリンオキシダーゼを提供する。

【構成】 ギルコニンオキシダーゼ活性を有するタンパク質を蛋白工学的手法により改変したN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素およびその製法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 水および酸素の存在下でN-メチルバリンに作用して、バリン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成することを特徴とするN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素。

【請求項2】 下記理化学的性質を有する請求項1記載のN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素。

作用：水および酸素の存在下でN-メチルバリンに作用して、バリン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成する。

基質特異性：N-メチルバリン 100%

ザルコシン ≤1%

至適pH：7～9

至適温度：40～50℃

分子量：43Kd

【請求項3】 配列表・配列番号1に記載されるアミノ酸配列の第103番目のフェニルアラニンがバリンに置換されたことを特徴とする請求項1記載のN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素。

【請求項4】 ザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質を構成するアミノ酸配列のフェニルアラニンを他のアミノ酸に置換することを特徴とするN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素の製造法。

【請求項5】 配列表・配列番号1に記載されるアミノ酸配列の第103番目のフェニルアラニンをコードする遺伝子を部位特異的変異させることにより、他のアミノ酸に置換して、N-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する酵素を製造することを特徴とする請求項4に記載されるN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素の製造法。

【請求項6】 他のアミノ酸がバリンであることを特徴とする請求項4または5記載のN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素の製造法。

【請求項7】 検体中のN-メチルバリンに、水および酸素の存在下でN-メチルバリンに作用して、バリン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成するN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素を用い、消費する酸素または生成するバリン、ホルムアルデヒドあるいは過酸化水素を測定することを特徴とするN-メチルバリンの定量法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素、その製造法およびその用途に関し、特にザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質を構成するアミノ酸配列を改変することにより得られたN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規酵素、その製造法およびその用途に関する。

【0002】

【従来の技術】 N-メチルバリンに作用して過酸化水素を生成する酵素は、未だ自然界から見い出されていず、また人工的にも生産されていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明はN-メチルバリンの測定に有用であるN-メチルバリンオキシダーゼを求めるべく、鋭意検討していたところ、ザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質を蛋白工学的手法により改変し、N-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素を造成することを見出した。

【0004】

【課題を解決するための手段】 すなわち本発明は水および酸素の存在下でN-メチルバリンに作用して、バリン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成することを特徴とするN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素である。

【0005】 また本発明はザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質を構成するアミノ酸配列のフェニルアラニンを他のアミノ酸に置換することを特徴とするN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素の製造法である。具体的には、配列表・配列番号1に記載されるアミノ酸配列の第103番目のフェニルアラニンをコードする遺伝子を部位特異的変異させることにより、他のアミノ酸に置換して、N-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する酵素を製造することを特徴とする。他のアミノ酸としてはバリンが好ましい。

【0006】 さらに本発明は検体中のN-メチルバリンに、水および酸素の存在下でN-メチルバリンに作用してバリン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成するN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素を用い、消費する酸素または生成するバリン、ホルムアルデヒドあるいは過酸化水素を測定することを特徴とするN-メチルバリンの定量法である。

【0007】 水および酸素の存在下でN-メチルバリンに作用して、バリン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成するN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する本発明の酵素の具体例としては、下記理化学的性質を有する酵素が挙げられる。作用：水および酸素の存在下でN-メチルバリンに作用して、バリン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成する。

基質特異性：N-メチルバリン 100%

ザルコシン ≤1%

至適pH：7～9

至適温度：40～50℃

分子量：43Kd

【0008】 さらに具体的な例としては、アミノ酸配列が配列表・配列番号1に記載されるアミノ酸配列の第103番目のフェニルアラニンがバリンに置換されたN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規なタンパク質が挙げられる。

【0009】本発明の新規な酵素は、ザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質を構成するアミノ酸配列のうちフェニルアラニンを他のアミノ酸に置換して、製造される。

【0010】本発明に使用されるザルコシンオキシダーゼとしては、例えばバチルス属、コリネバクテリウム属、アースロバクター属のザルコシンオキシダーゼなどがあり、特に限定されないが、本発明の実施例においては、アースロバクター・エスピーTE1826のザルコシンオキシダーゼ (Jounal of Fermentation and Bioengineering Vol.75 No.4 pp239-244 (1993)) に記載を用いた。

【0011】ザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質を構成するアミノ酸配列を改変する方法としては、通常行われる遺伝情報を改変する手法が用いられる。すなわち、ザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質の遺伝情報を有するDNAの特定の塩基を変換することにより、或いは特定の塩基を挿入または欠失させることにより、改変タンパク質の遺伝情報を有するDNAが作成される。

【0012】DNA中の塩基を変換する具体的な方法としては、例えば市販のキット (Transformer™; Clontech 製, T7-GEN in vitro mutagenesis kit; Stratagene 製) の使用、或いはPCR法の利用が挙げられる。

【0013】具体的にはまず親タンパク質を産生する細胞から染色体DNAを分離する。得られた染色体DNAを制限酵素、例えばSau3aIで部分分解させ、断片に分離した後、同じ制限酵素で切断したプラスミドとDNAリガーゼによりDNAを連結する。連結したDNAはエシェリヒア・コリーのコンピテントセルを用いて形質転換する。得られたコロニーは培地で培養し、遺伝子が挿入された組換えDNAをスクリーニングする。次いで挿入DNA断片を種々の制限酵素により切断して他のプラスミドにサブクローニングし、挿入DNA断片を有するプラスミドを得る。種々のサブクローンは通常に従い、SEQUENASE VERSION2.0 7-deaza-d GTP kit (東洋紡績製) を用いて、配列決定を行う。

【0014】次いでフェニルアラニンをコードする塩基を他のアミノ酸をコードする塩基に置換したオリゴヌクレオチドおよびTransformer™ (Clontech 製) を用い、Transformer™ のプロトコールに従い、フェニルアラニン残基が他のアミノ酸、好ましくはバリンに置換された改変タンパク質の遺伝情報を有するDNAを作成する。

【0015】作成された改変タンパク質の遺伝情報を有するDNAは、プラスミドと連結された状態で宿主微生物中に移入され、改変タンパク質を生産する形質転換体となる。この際のプラスミドとしては、例えばエシェリヒア・コリーを宿主微生物とする場合には、pBluescript, pUC18などが使用できる。

【0016】宿主微生物としては、例えばエシェリヒア

・コリー W3110、エシェリヒア・コリーC500、エシェリヒア・コリーJM109、エシェリヒア・コリーDH5 α などが利用できる。宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシェリヒア属に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で組換えDNAの移入を行なう方法などを採用することができ、更にエレクトロポレーション法を用いても良い。

【0017】こうして得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量の改変タンパク質を安定して生産し得る。形質転換体である宿主微生物の培養形態は宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、通常多くの場合は液体培養で行うが、工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。培地の栄養源としては微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては酸化可能な炭素化合物であればよく、例えばグルコース、シュクロース、ラクトース、マルトース、フラクトース、糖蜜、ビルビン酸などが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、硫酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガ、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

【0018】培養温度は菌が発育し、改変タンパク質を生産する範囲で適宜変更し得るが、エシェリヒア・コリーの場合、好ましくは20~42℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、改変タンパク質が最高収量に達する時期を見計らって適当時期に培養を終了すればよく、通常は6~48時間程度である。培地pHは菌が発育し改変タンパク質を生産する範囲で適宜変更し得るが、特に好ましくはpH6.0~9.0程度である。

【0019】培養物中の改変タンパク質を生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し利用することもできるが、一般には常法に従って改変タンパク質が培養液中に存在する場合は濾過、遠心分離などにより、改変タンパク質含有溶液と微生物菌体とを分離した後利用される。改変タンパク質が菌体内に存在する場合には、得られた培養物を濾過または遠心分離などの手段により菌体を取り出し、次いでこの菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的で破壊し、また必要に応じてEDTA等のキレート剤及びまたは界面活性剤を添加して改変タンパク質を可溶化し、水溶液として分離採取する。

【0020】この様にして得られた改変タンパク質含有溶液を例えば減圧濃縮、膜濃縮、更に硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、或いは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈澱法により沈澱せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。吸着剤或いはゲル濾過剤などによるゲル濾過、吸着クロマトグラフ

ィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーにより、精製されたN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する改変タンパク質を得る事ができる。

【0021】本発明のN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規な酵素は、検体中のN-メチルバリンオキシダーゼに水および酸素の存在下で作用して、バリン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成させる。次いで消費する酸素量または生成するアリン、ホルムアルデヒドあるいは過酸化水素を測定することによりN-メチルバリンを定量することができる。検体としては、アミノ酸誘導体合成中間物、医薬品合成中間物、N-メチルアミノ酸研究試料等が挙げられる。

【0022】消費する酸素の測定法としては、酸素電極を利用する方法などがある。また生成したバリンを測定する方法としては、アミノ酸分析計を用いる方法などがある。さらに生成するホルムアルデヒドを測定する方法としては、ホルムアルデヒド脱水素酵素を利用する方法などがある。生成する過酸化水素を測定する方法としては、従来から公知の方法を使用すればよく、例えばベルオキシダーゼと4-アミノアンチピリンとフェノール誘導体またはアニリン誘導体を使用する方法などがある。フェノール誘導体としては、フェノール、2, 4-ジクロロフェノール、p-クロロフェノールなどが挙げられる。アニリン誘導体としては、ジメチルアニリン、ジエチルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジンなどが挙げられる。

【0023】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明する。実施例中、酵素特性を示す指標であるKm、kcatを求める際のN-メチルバリンオキシダーゼ活性またはサルコシンオキシダーゼ活性の測定は以下に行なった。すなわち、48mMトリス緩衝液(pH8.0)、任意の濃度の基質(N-メチルバリンまたはサルコシン)、0.47mM4-アミノアンチピリン、2.0mMフェノール、0.04%トリトンX-100、4.5U/mlベルオキシダーゼ中で酵素を37℃、10分反応させ、500nmにおける吸光度を測定する。

【0024】実施例1 N-メチルバリンオキシダーゼの遺伝情報を有するDNAの作成

サルコシンオキシダーゼの遺伝情報を有する組換え体プラスミド、pSAOE3は以下の方法により作成した。アースロバクター・エスピーTE1826(農研機構寄第10637号)の染色体DNAを次の方法で分離した。同菌株を100mlの2×YT培地(1.6%ポリペプトン、1%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム(pH7.2))で37℃一晚振盪培養後、遠心分離(8000rpm, 10分)により集菌した。15mMクエン酸ナトリウム、0.15M塩化ナトリウムを含んだ溶液で菌体を洗浄した後、20%シュウクロース、1mM EDT

A、50mMトリス塩酸(pH7.5)を含んだ溶液5mlに懸濁させ、0.5mlのリゾチム溶液(100mg/ml)を加えて37℃、30分間保温した。次いで11mlの1%ラウロイルサルコシン酸、0.1M EDTA(pH8.6)を含む溶液を加えた。この懸濁液に臭化エチジウム溶液を0.5%、塩化セシウムを約100x加え、攪拌混合し、55,000rpm、20時間の超遠心でDNAを分取した。分取したDNAは、10mMトリス塩酸(pH8.0)、1mM EDTAを含んだ溶液(TE)で透析し、精製したDNA標品とした。エシェリヒア・コリJM109のコンピテントセルはHanahanの方法により作成し、ライブラリー作成の宿主として用いた。

【0025】染色体DNA 1μgを制限酵素Sau3A1

(東洋紡製)で部分分解反応させ、2kbp以上の断片に分解した後、SalI(東洋紡製)で切断したpUC18 0.5μgとM.G.LoftusらのBACKFILLING法(Biotechniques Vol12, No.2(1992))に従い、T4-DNAリガーゼ(東洋紡製)1ユニットで15℃、12時間反応させ、DNAを連結した。連結したDNAはエシェリヒア・コリJM109のコンピテントセルを用いて形質転換した。使用したDNA 1μg当たり約1×10⁸個の形質転換体のコロニーが得られた。得られたコロニーは50μg/mlアンピシリン、0.5%サルコシン、0.005%パラオースアニリン及び0.02%ソディウムハイドロジェンサルファイト入り培地(1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム)で37℃、16時間培養し、赤色コロニーを指標にサルコシンオキシダーゼ遺伝子の入った組換えDNAをスクリーニングした。その結果約1,000個のコロニーのうち1株の割合で赤色を示すコロニーを得た。この中の1株が保有するプラスミドには約8.7kbpの挿入DNA断片が存在しており、このプラスミドをpSAO1とした。次いでpSAO1より挿入DNA断片を種々の制限酵素により切断してpUC18にサブクローニングし、約1.7kbpの挿入DNA断片を有するpSAOEP3を得た。

【0026】pSAOEP3の約1.7kbpの挿入DNA断片について種々の制限酵素で切断してサブクローンを調製した。種々のサブクローンは富法に従い、SEQUENASE VERSION2.0 7-deaza-dGTP kit(東洋紡製)を用いて、DNA配列の決定を行った(配列表・配列番号2)。該DNA配列から決定したアミノ酸配列を配列表・配列番号1に示した。次いで、配列表の配列番号3のオリゴヌクレオチドとTransformer™(Clontech製)を用い、Transformer™のプロトコールに従い、配列表の配列番号1記載の第103番目のフェニルアラニンがバリンに置換された改変タンパク質(F103V)の遺伝情報を有するDNAを作成した。F103Vの遺伝情報を有するDNAを保持する組換え体プラスミドを、pSAOEP3-F103Vと命名した。(図1参照)

【0027】実施例2 形質転換体の作成

プラスミド、pSAOEP3-F103Vでエシェリヒア・コリJM109のコンピテントセルを氷中30分間接触後、42℃

で45秒間ヒートショックを行うことにより形質転換し、形質転換体 JM109(pSACEP3-F103V)を得た。

【0028】実施例3 形質転換体の培養と改変タンパク質の精製

2×YT培地(1.6% ボリペプトン、1%酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム(pH7.2))50mlを500mlプラスコに分注し、121°C、15分間オートクレーブを行い放冷後、別途無菌濾過した50mg/mlアンピシリン(ナカライテスク製)を0.1%添加した。この培地に上記と同一組成の培地で予め37°Cで16時間振盪培養した形質転換体 JM109(pSACEP3-F103V)の培養液1mlを接種し、37°Cで通気攪拌培養した。培養液より改変タンパク質(F103V)を、菌体破砕、除核酸、塩析後、イオン交換カラムクロマト*

* グラフィーを実施することにより(Journal of Fermentation and Bioengineering Vol.75 No.4 pp239-244 (1993)参照)、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて単一のバンドを形成するまで精製した。精製タンパク質の分子量は43Kd、至適pHは7~9、至適温度は40~50°Cであった。

【0029】精製された改変タンパク質(F103V)とアースロバクター・エスピーTE1826のザルコシンオキシダーゼ(東洋紡績製)のKm、kcat測定値を表1に示した。

【0030】

【表1】

基 質	アースロバクター・エスピーTE1826 由来ザルコシンオキシダーゼ			F103V		
	Km(mM)	kcat(s ⁻¹)	Km/kcat	Km(mM)	kcat(s ⁻¹)	Km/kcat
ザルコシン	3.6	14	3.9	120	5.3	0.044
N-メチルバリン	110	7.9	0.072	1.2	5.5	4.6

【0031】改変タンパク質(F103V)の特性は、N-メチルバリンオキシダーゼ活性を有することである。酵素の反応性を示す指標であるkcat/Kmを見ると、ザルコシンオキシダーゼはザルコシンに対する反応性がN-メチルバリンの反応性の約5.4倍であるのに対し、改変タンパク質(F103V)はN-メチルバリンに対する反応性がザルコシンに対する反応性の約10×30

※5倍であった。すなわち、改変タンパク質(F103V)はN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規酵素であることが明らかとなった。

【0032】実施例4 N-メチルバリンオキシダーゼを用いたN-メチルバリンの測定
検体中のN-メチルバリン濃度を、下記試薬を用いて下記測定法により測定した。

試薬

トリス緩衝液(pH8.0)	50mM
F103Vまたはザルコシンオキシダーゼ	0.1mg/ml
4-アミノアンチピリン	0.42mM
フェノール	1.8mM
ペルオキシダーゼ	4.7U/ml

【0033】測定方法

N-メチルバリン水溶液2mM(100mMトリス緩衝液(pH8.0)にて溶解)の10段階希釈液を検体とし、各100μlを採取し、これに上記試薬3mlを加えて30°Cで3分間反応させて、500nmにおける吸光度を求めた。なお、ブランクはN-メチルバリン含有緩衝液の代わりに蒸留水を用いた。図1に検体の希釈直線性を示した。図1より明かなように、本発明のN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規酵素を用いることにより、短時間に正確かつ簡単にN-メチルバリンを測定することができる。ザルコシンオキシダーゼを使用すると、感度不足でN-メチルバリンを測定できなかった。

【0034】

【発明の効果】本発明によって、ザルコシンオキシダーゼ活性を有するタンパク質を蛋白工学的手法を用いて改変し、N-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規酵素を供給することが可能となった。本発明のN-メチルバリンオキシダーゼ活性を有する新規酵素は、検体中のN-メチルバリン量の測定に使用することができる。

【0035】

【配列表】

配列番号：1
配列の長さ：389
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：蛋白質

50 起源

生物名: アースロバクター・エスピー (Arthrobacter S P.) * 株名: TE1826

配列

```

Met Ser Ile Lys Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser
  1           5           10          15
Met Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ser Lys Gln Gly Val Lys Thr
      20           25           30
Leu Leu Val Asp Ser Phe His Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His
      35           40           45
Gly Asp Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr
      50           55           60
Val Pro Phe Ala Leu Arg Ala Gln Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys
      65           70           75           80
Glu Thr His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val Leu Val Phe Gly
      85           90           95
Pro Lys Gly Glu Ala Pro Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys
      100          105          110
Glu His Ser Leu Asp Val Asp Leu Leu Glu Gly Ser Glu Ile Asn Lys
      115          120          125
Arg Trp Pro Gly Val Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile Phe Glu
      130          135          140
Lys Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg
      145          150          155          160
Glu Leu Ala Glu Ala Asn Gly Ala Lys Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val
      165          170          175
Glu Asp Phe Glu Ile Ala Glu Asp Phe Val Lys Ile Gln Thr Ala Tyr
      180          185          190
Gly Ser Phe Thr Ala Ser Lys Leu Ile Val Ser Met Gly Ala Trp Asn
      195          200          205
Ser Lys Leu Leu Ser Lys Leu Asn Ile Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr
      210          215          220
Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu Cys Asp Glu Lys Lys Tyr Ser Asn
      225          230          235          240
Thr His Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Thr Gly Ile Tyr
      245          250          255
Tyr Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Cys Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His
      260          265          270
Thr Tyr Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly
      275          280          285
Ile Tyr Pro Glu Asp Glu Gly Asn Ile Arg Lys Phe Leu Glu Thr Tyr
      290          295          300
Met Pro Gly Ala Thr Gly Glu Leu Lys Ser Gly Ala Val Cys Met Tyr
      305          310          315          320
Thr Lys Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Gln Phe
      325          330          335
Ser Asn Val Ala Ile Ala Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe
      340          345          350
Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Val Thr Gly Lys
      355          360          365
Thr Glu His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys

```

BEST AVAILABLE COPY

(7)

特開平7-170976

11

12

370

375

380

Gln Lys Glu Thr Ile

385

【0036】配列番号: 2

配列の長さ: 1670

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: genomic DNA

起源:

生物名: アースロバクター・エスピー (Arthrobacter s p.)

株名: TE1826

配列の特徴

特徴を表す記号: -35 signal

存在位置: 114...119

* 特徴を決定した方法: S

特徴を表す記号: -10 signal

存在位置: 237...242

特徴を決定した方法: S

特徴を表す記号: CDS

存在位置: 298...1464

10 特徴を決定した方法: P

特徴を表す記号: mal peptide

存在位置: 301...1464

特徴を決定した方法: E

他の情報: ギルコシンオキダーゼ活性を有する蛋白質を

コードする遺伝子。

*

配列

CTCCAGTCT TCCTCAGCT TTTCATCCT CAGCGTAACA TAAGATTGAA CATAATTAA 60
 ACTTTTGGCC GCGTTTGAAA CGCTGCCATA TTCAACTAGC TTTTGAAAA TCTGCAATC 120
 TTAAATTCC AAGTATAATC ACTGCCAAA CGTTCTTTTA CTACTAGCAG TAGAATATT 180
 CTAAAAGTGA TAGCTGCTAT CACTTTTAAG CATTTCATC GATGCCCAAT AGCGCGTATG 240
 ATGTAAATAG ATAATTAAGA AAATTCAAAT TACCTGTTTG AAAAAGGAGA GGAACA 297
 ATG AGT ATT AAA AAA CAT TAT CAT GTA ATT GTG GTT GGC GCT GGT TCC 345
 Met Ser Ile Lys Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser
 1 5 10 15
 ATG GCA ATG GCA GCT GCG TAC TAT CTG TCT AAA CAA GGT GTT AAA ACA 393
 Met Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ser Lys Gln Gly Val Lys Thr
 20 25 30
 CTA TTG GTA GAT TCA TTT CAT CCT CCC CAT ACA AAT GGC AGC CAT CAT 441
 Leu Leu Val Asp Ser Phe His Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His
 35 40 45
 GGC GAT ACA GCG ATC ATT CGT CAC GCA TAT GGC GAA GGA AGA GAG TAT 489
 Gly Asp Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr
 50 55 60
 GTA CCG TTT GCG TTG AGA GCA CAA GAG TTA TCG TAT GAA TTA GAA AAG 537
 Val Pro Phe Ala Leu Arg Ala Gln Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys
 65 70 75 80
 GAG ACT CAT CAT AAA ATA TTT ACA AAA ACA GGT GTA CTC GTT TTT GGT 585
 Glu Thr His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val Leu Val Phe Gly
 85 90 95
 CCT AAA GGA GAA GCT CCT TTC GTT GCC GAA ACA ATG GAA GCC GCA AAG 633
 Pro Lys Gly Glu Ala Pro Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys
 100 105 110
 GAA CAT TCA TTA GAT GTT GAT TTA CTA GAA GGA AGT GAA ATA AAT AAG 681
 Glu His Ser Leu Asp Val Asp Leu Leu Glu Gly Ser Glu Ile Asn Lys
 115 120 125
 CGT TCG CCA GGT GTA ACG GTT CCT GAG AAT TAT AAT GCT ATT TTT GAA 729
 Arg Trp Pro Gly Val Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile Phe Glu
 130 135 140
 AAA AAT TCT GGT GTC TTA TTT AGT GAA AAT TGT ATT GGC GCT TAC GGT 777

BEST AVAILABLE COPY

13

14

Lys Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg
 145 150 155 160
 GAA TTG GCG GAA GCA AAT GGT GCG AAA GTT CTA ACG TAC ACA CCC GTT 825
 Glu Leu Ala Glu Ala Asn Gly Ala Lys Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val
 165 170 175
 GAA GAT TTC GAG ATT GCG GAG GAC TTC GTC AAA ATC CAA ACC GCC TAT 873
 Glu Asp Phe Glu Ile Ala Glu Asp Phe Val Lys Ile Gln Thr Ala Tyr
 180 185 190
 GCG TCC TTT ACA GCG AGT AAA TTA ATT GTT AGC ATG GCG GCT TGG AAT 921
 Gly Ser Phe Thr Ala Ser Lys Leu Ile Val Ser Met Gly Ala Trp Asn
 195 200 205
 AGC AAA CTG CTA TCA AAA TTA AAT ATT GAA ATC CCA TTG CAG CCA TAC 969
 Ser Lys Leu Ser Lys Leu Asn Ile Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr
 210 215 220
 CGT CAA GTT GTC CGA TTC TTC GAA TGT GAT GAA AAA AAA TAT AGC AAT 1017
 Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu Cys Asp Glu Lys Lys Tyr Ser Asn
 225 230 235 240
 ACA CAT GGT TAT CCG GCG TTC ATG GTC GAA GTC CCA ACT GCG ATC TAT 1065
 Thr His Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Thr Gly Ile Tyr
 245 250 255
 TAC GGA TTT CCA AGC TTC GCG GCG TGC GCG TTG AAA ATA GCG TAT CAT 1113
 Tyr Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Cys Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His
 260 265 270
 ACG TAT GGT CAA AAA ATC GAT CCA GAT ACG ATT AAT GGT GAA TTT GGT 1161
 Thr Tyr Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly
 275 280 285
 ATT TAC CCG GAG GAT GAA GCG AAT ATT CCG AAA TTC CTG GAA ACA TAT 1209
 Ile Tyr Pro Glu Asp Glu Gly Asn Ile Arg Lys Phe Leu Glu Thr Tyr
 290 295 300
 ATG CCG GGA GCA ACC GCG GAA TTA AAA AGT GCG GCA GTT TGC ATG TAC 1257
 Met Pro Gly Ala Thr Gly Glu Leu Lys Ser Gly Ala Val Cys Met Tyr
 305 310 315 320
 ACA AAA ACA CCT GAT GAG CAT TTC GTG ATT GAT TTA CAT CCT CAA TTC 1305
 Thr Lys Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Gln Phe
 325 330 335
 TCG AAT GTC GCG ATT GCA GCG GGA TTC TCC GCA CAT GCG TTT AAA TTC 1353
 Ser Asn Val Ala Ile Ala Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe
 340 345 350
 TCA ACC GTA GTT GGT GAA ACA TTA AGT CAA TTA GCT GTA ACC GGT AAA 1401
 Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Val Thr Gly Lys
 355 360 365
 ACA GAA CAC GAT ATT TCC ATC TTT TCA ATC AAT CCG CCT GCT TTA AAA 1449
 Thr Glu His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys
 370 375 380
 CAA AAA GAA ACG ATT TAAAAAGCA AGCAAGCCGT ACATAAATTT CGATAGATAT 1504
 Gln Lys Glu Thr Ile
 385
 TATGTACGGC TTACTTTATT TACAACCTAA AAATCTGCAT ATCAATCCTG TCCCTCTACT 1564
 GATTGAAGCA CAAACTGTAC TTGAACGGCT TTTTATTAA CTGTAAAGCA TAACAGGAAC 1624
 GCTAAATAA GAAGACGGCT GCATAAGAAT AGTACGGGAG GAATTC 1670

BEST AVAILABLE COPY

(9)

特開平7-170976

15

16

【0037】配列番号: 3

配列の長さ: 39

配列の型: 核酸 (DNA)

配列

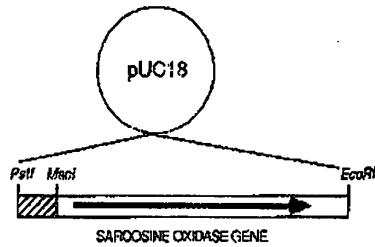
GGTCC TAAAG GAGAA GCTCC TGTGG TTGCC GAAAC AATG 39

【図面の簡単な説明】

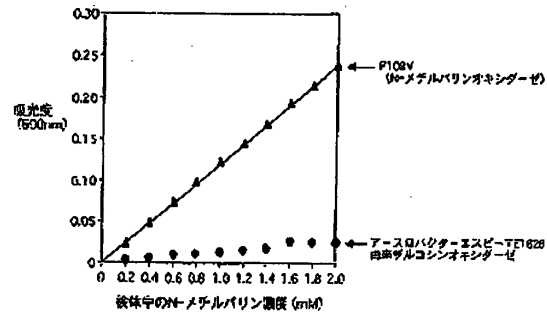
※【図2】N-メチルバリン測定の新規直線性を示す。

【図1】プラスミド、pSACEP3-F103V の構造を示す。 ※

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

片内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:19

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

BEST AVAILABLE COPY